

研究者：谷口 礼（所属：九州歯科大学口腔機能発達学分野）

研究題目：転写因子 NF- κ B による骨代謝調節機構の解明と小児続発性ステロイド性骨粗鬆症治療への応用

目 的：

近年、喘息やアレルギー疾患をもつ小児が増加しており、その治療にステロイド製剤が多く用いられている。しかし、ステロイド製剤の長期投与や大量投与は続発性ステロイド性骨粗鬆症を引き起こす。現在、続発性ステロイド性骨粗鬆症の治療には、強力な骨吸収抑制作用を持つビスホスホネート（BP）製剤が広く用いられているが、BP 製剤を長期投与すると骨のリモデリングが破綻し、骨成長が抑制される。このことから骨のリモデリングに影響せず骨吸収を抑制する薬剤の開発が望まれている。

骨リモデリングを担う破骨細胞分化には、骨芽細胞が産生する receptor activator of nuclear factor- κ B ligand（RANKL）による破骨細胞前駆細胞（Osteoclast precursors：OCP）の nuclear factor- κ B（NF- κ B）の活性化が必須である。NF- κ B の活性化機構は主にインターロイキン 1 や Tumor necrosis factor α などの炎症性サイトカインにより活性化される古典的経路と、CD40 リガンドやリンホトキシン β などのリンパ節形成に関わる因子によって活性化される非古典的経路に分けられる。

NF- κ B 非古典的経路に重要な NIK 遺伝子の機能欠失型変異を有するリンパ形成不全（*aly/aly*）マウスは IKK α の活性化が起きないことから、NF- κ B2 の p100 から p52 へのプロセシングが阻害され、更に破骨細胞形成が抑制される。一方、NF- κ B2 の前駆体 p100 と NF- κ B2 の活性型 p52 の存在しない NF- κ B2 遺伝子欠損（NF- κ B2-/-）マウスでは野生型（WT）マウスと同程度の破骨細胞が存在することから p100 が破骨細胞形成を阻害していることが考えられる。そこで本研究では NF- κ B2 とヘテロダイマーを形成し転写活性を調節する RelB の破骨細胞分化における役割について検討した。

対象および方法：

1. 野生型、*aly/aly* および NF- κ B2-/- マウスの破骨細胞分化と細胞内シグナリングの相関の検討：各々のマウスより骨髓細胞を調製し、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）存在下で 3 日間培養し、OCP を誘導した。さらに RANKL で刺激し、ウエスタンブロット法で検討した。
2. 破骨細胞分化における RelB の役割の検討：レトロウィルスベクターを用いて、*aly/aly* マウス骨髓細胞に RelB 遺伝子を遺伝子導入、M-CSF および RANKL で刺激し、形成された破骨細胞数を計測した。また、p100 から p52 へのプロセシングを検討した。
3. RelB と p100 のプロセシングの相関の検討：NF- κ B2-/- マウス由来 OCP にプロセシングされない p100 の変異体である p100 Δ GRR を遺伝子導入し、形成された破骨細胞数を計測した。
4. RelB 過剰発現により誘導される遺伝子の検討：RelB を過剰発現させ、RANKL 刺激後の

mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法を用いて確認した。

5. RelB 過剰発現により誘導される Cot の役割を検討：shRNA を用いて Cot の発現を抑制し、破骨細胞数を計測した。
6. Cot による活性化される因子の検討：NIK による活性化を受けない不活性型 IKK α (IKK α AA) と Cot を遺伝子導入し、形成された破骨細胞数を計測した。

結 果：

1. *aly/aly* マウス由来の骨髄細胞では、破骨細胞形成が抑制され、p100 のプロセッシングおよび RelB の核移行が見られなかった。
2. *aly/aly* マウス由来 OCP に RelB を過剰発現させると破骨細胞形成の抑制が解除され、p100 から p52 へのプロセッシングが誘導された。
3. NF- κ B2 $^{-/-}$ マウスでは破骨細胞形成に異常は見られなかったが、p100 Δ GRR を過剰発現すると破骨細胞形成が抑制され、p100 Δ GRR にさらに RelB を共発現しても抑制効果は回復しなかった。
4. RelB を過剰発現させ、RANKL で刺激すると Cot 遺伝子の発現上昇がマイクロアレイ解析により認められ、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法においても同様の結果が得られた。
5. shRNA を用いて Cot の発現を抑制すると *aly/aly* マウスにおいて RelB 過剰発現による破骨細胞形成の回復が認められなかった。
6. 野生型マウスにおいて IKK α AA の過剰発現により破骨細胞形成は抑制されたが、IKK α AA と Cot を共発現すると破骨細胞形成の抑制が解除された。IKK α AA の 23 番目のスレオニンをアラニンに置換し Cot からの活性化を受けない IKK α AAT23A と Cot を共発現すると破骨細胞形成の抑制が解除されなかった。

考 察：

aly/aly マウス由来の OCP に RelB を過剰発現させると、Cot の発現が上昇し、NIK とは異なるメカニズムで IKK α を活性化することにより破骨細胞分化の抑制を解除することが明らかになった。このことから RelB、Cot による情報伝達機構は破骨細胞の分化制御に応用できると考えられる。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・ RelB-induced expression of Cot, a MAP3K, rescues RANKL-induced osteoclastogenesis in alymphoplasia mice by promoting NF- κ B2 processing by IKK α (*J. Biol. Chem.* 2014, 289 : 7349-7361.)
- ・ RelB の過剰発現は破骨細胞分化を誘導する，第 31 回日本小児歯科学会九州地方会大会，平成 25 年 10 月 20 日
- ・ RelB による Cot の発現上昇は破骨細胞分化に重要である，第 52 回日本小児歯科学会大会，平成 26 年 5 月 16 日・17 日